



⑮ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 195 02 912 A 1

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
C 07 H 21/00  
A 61 K 31/70

②① Aktenzeichen: 195 02 912.7  
②② Anmeldetag: 31. 1. 95  
④③ Offenlegungstag: 1. 8. 96

DE 195 02 912 A 1

⑦① Anmelder:  
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

⑦② Erfinder:  
Peyman, Anuschirwan, Dr., 65779 Kelkheim, DE;  
Uhlmann, Eugen, Dr., 61479 Glashütten, DE

⑤④ G-Cap Stabilisierte Oligonucleotide

⑤⑦ Die Erfindung betrifft Oligonucleotide der Formel  
5'-(CAP)-(Oligo)-(CAP)-3'  
wobei (Oligo) für eine Nucleotidsequenz der Länge 10 bis 40  
Nucleotide steht und CAP für G<sub>m</sub> steht, wobei m eine ganze  
Zahl von null bis zehn, bevorzugt von zwei bis sechs,  
besonders bevorzugt von drei bis fünf und ganz besonders  
bevorzugt vier bedeutet und wobei beide im Molekül  
vorkommenden CAPs unabhängig voneinander definiert sein  
können und im Falle, wenn m am 5'- oder 3'-Ende gleich null  
ist und das Ende der "Oligo"-Sequenz von keinem Guanin  
gebildet wird, verschieden sein müssen, Verfahren zu ihrer  
Herstellung, Arzneimittel enthaltend die erfindungsgemäßen  
Oligonucleotide und ihre Verwendung zur Herstellung eines  
Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen oder zur  
Herstellung eines Diagnostikums.

DE 195 02 912 A 1

## Beschreibung

Antisense Oligonucleotide (AO), Tripel Helix Bildende Oligonucleotide (TFO) und sense Oligonucleotide erwiesen sich als spezifische Inhibitoren der Genexpression in einer Vielzahl von Systemen, sowohl in vitro als auch in vivo [Uhlmann & Peyman, Chem. Rev. 1990, 90, 543; Milligan et al., J. Med. Chem. 1993, 36, 1923; Stein & Cheng, Science 1993, 261, 1004; Bielinski et al., Science 1990, 250, 997].

Eines der Hauptprobleme bei der Verwendung natürlich vorkommender Phosphodiester (PO) Oligonucleotide ist deren rascher Abbau durch verschiedene nucleolytische Aktivitäten sowohl in Zellen, wie auch im Zellkultur-Medium. Zur Stabilisierung von Oligonucleotiden wurden verschiedene chemische Modifikationen eingesetzt. Eine Übersicht über den Stand der Technik geben beispielsweise Uhlmann & Peyman, supra und P.D. Cook [Antisense Research and Applications, Crooke und Lebleu, Eds., Chapter 9, S. 149ff, CRC Press Boca Raton 1993]. Die Stabilisierung gegen nucleolytischen Abbau kann durch die Modifikation oder Ersatz der Phosphatbrücke, des Zuckerbausteins, der Nucleobase oder durch Ersatz des Zucker-Phosphat-Rückgrats der Oligonucleotide erfolgen. Da die Phosphatbrücke das Zentrum des nucleolytischen Angriffs ist, wurden insbesondere zahlreiche Modifikationen der Internucleosidbrücke beschrieben. Die am häufigsten verwendeten nucleaseresistenten Internucleosidbrücken sind Phosphorothioat-(PS), Methylphosphonat- (MeP) und Phosphorothioat-(PA) Brücken. Eine weitere Möglichkeit der Stabilisierung sind "hairpin" oder "self-stabilized" Oligonucleotide wie sie z. B. bei Tang et al. [Nucl. Acids Res. 21 : 2729, 1993] beschrieben werden.

Ein weiteres Problem der Antisense Technologie ist die oft unzureichende Zellpenetration der Oligonucleotide. Zur Verbesserung wurden auch hier zahlreiche chemische Modifikationen eingesetzt. Eine Übersicht über den Stand der Technik geben Uhlmann & Peyman, supra und P.D. Cook, supra. Diese Modifikationen beinhalten u. a. lipophile Konjugat-Gruppen am 5'- oder 3'-Ende der Oligonucleotide und neutrale oder ionische "backbone"-Modifikationen sowie 2'-Modifikationen am Pentofuranosylring. Hughes [Antisense Research and Development 4 : 211, 1994] zeigen, daß die Zell-Aufnahme von einem 10-meren Homo-G Phosphorothioat etwa um den Faktor 2 höher ist als die Zell-Aufnahme der 10-meren Homo-Oligomeren Phosphorothioate von T, A, oder C.

Blackburne [Nature 350 : 569, 1991] beschreibt Strukturen, die von G-reichen Oligonucleotiden eingenommen werden können. G-reiche Oligonucleotide mit mindestens vier kurzen Abschnitten mit G-Resten sind in der Lage, in Gegenwart von  $\text{Na}^+$  oder  $\text{K}^+$  kompakte intramolekulare Strukturen zu bilden, die als stabilisierendes Element sogenannte G-Quartette enthalten, dies sind vier in einer Ebene über Hoogsten Basenpaarung verknüpfte Guanin-Reste. Mehrere solche Elemente sind übereinander angeordnet. Oft sind Oligonucleotide zu kurz, um solche intramolekularen Strukturen auszubilden. In solchen Fällen können G-Quartett Strukturen durch Assoziation zweier Oligonucleotide gebildet werden.

Es wurde nun gefunden, daß es eine sehr einfache Möglichkeit gibt, unmodifizierte oder modifizierte (Art der Modifikation siehe ab Seite 4) Oligonucleotide hinsichtlich ihrer Nuclease-Resistenz und Zellpenetration deutlich zu verbessern nämlich durch Verlängerung der Oligonucleotide am 3'- und/oder 5'-Ende um ein bis 10 Guanine, so daß die Wirksamkeit erheblich verbessert wird.

Überraschenderweise zeigen auch die erfindungsgemäßen Oligonucleotide eine Tendenz zur Assoziation bzw. Aggregation. Möglicherweise bilden auch sie G-Quartett Strukturen durch Assoziation zweier oder mehrerer Oligonucleotide. Solche Strukturen würden gegen Exonuclease Abbau schützen und zu einer erhöhten Aufnahme in die Zelle führen. Da die assoziierten Strukturen immer auch im Gleichgewicht mit den "freien", Oligonucleotiden stehen, stünde auch immer genügend "freies" Oligonucleotid zur Translations- bzw. Transkriptionskontrolle zur Verfügung.

Gegenstand der Erfindung sind Oligonucleotide der Formel

5'—(CAP)—(Oligo)—(CAP)—3'

wobei Oligo beispielsweise für

ACACCCAATTCTGAAAATGG	(I),	
AGGTCCCTGTTCTGGGCGCCA	(II),	
GTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA	(III),	5
GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAA	(IV),	
GTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTG	(V),	10
GTCTCCGCTTCTTCTTCCTGCCATAGG	(VI),	
GCGGGGCTCCATGGGGGTCTG	(VII),	
CAGCTGCAACCCAGC	(VIII),	15
GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC	(IX),	
AACGTTGAGGGGCAT	(X),	20
GTGCCGGGGTCTTCGGGC	(XI),	
GGAGAACATCATGGTCGAAAG	(XII),	
CCCGAGAACATCATGGTCGAAG	(XIII),	25
GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG	(XIV),	
CACCCGCCTTGGCCTCCAC	(XV),	
GGGACTCCGGCGCAGCGC	(XVI),	30
GGCAAACCTTCTTTCTCC	(XVII),	
GGGAAGGAGGAGGATGAGG	(XVIII),	35
GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG	(XIX),	
GCAGTAAGCATCCATATC	(XX),	
CCCCCACCCTTCCCCTCTC	(XXI),	40
CTCCCCCACCCTTCCCCTC	(XXII),	
GCTGGGAGCCATAGCGAGG	(XXIII),	
ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG	(XXIV),	45
CAATCAATGACTTCAAGAGTTC	(XXV),	
GGTCCCTGTTCTGGGCGCCA	(XXVI),	50
GTGCCGGGGTCTTCGGG	(XXVII),	
GGAGGATGCTGAGGAGG	(XXVIII),	
GGAGGATGCTGAGG	(XXIX),	55
CAGGAGGATGCTGAGGAGG	(XXX),	
GGCTGCCATGGTCCC	(XXXI),	60
TCATGGTGTCTTTGCAGCC	(XXXII),	
TCATGGTGTCTTTGCAG	(XXXIII),	
AAGTTCATGGTTTCGG	(XXXIV),	65

und CAP für  $G_m$  steht, wobei  $m$  eine ganze Zahl von null bis zehn, bevorzugt von zwei bis sechs, besonders bevorzugt von drei bis fünf und ganz besonders bevorzugt vier bedeutet und wobei beide im Molekül vorkommenden CAP's unabhängig voneinander definiert sein können und im Falle, wenn  $m$  am 5'- oder 3'-Ende gleich null ist und das Ende der "Oligo"-Sequenz von keinem Guanin gebildet wird, verschieden sein müssen.

In den Fällen, in denen das Oligonucleotid (Oligo) am 5'- bzw. 3'-Ende mit einem oder mehreren Guaninen endet, kann es vorteilhaft sein, wenn CAP für  $G_{(m-n)}$  steht, wobei  $m$  wie oben definiert ist und  $n$  die Zahl der natürlicherweise am 5'- oder 3'-Ende des Oligonucleotids (Oligo) vorkommenden Guanine bedeutet und wobei  $(m-n)$  bevorzugt für zwei bis sechs, besonders bevorzugt für drei bis fünf, ganz besonders bevorzugt für vier steht.

Die so abgewandelten Oligonucleotide können unmodifiziert oder modifiziert sein, wobei folgende Varianten zugelassen sein sollen:

a) Vollständiger oder teilweiser Ersatz der 3'- und/oder der 5'-Phosphorsäurediesterbrücken, beispielsweise durch eine Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-,  $(NR^1R^2)$ -Phosphoramidat-, Boranophosphat-, Phosphat- $(C_1-C_{21})$ -O-Alkylester, Phosphat- $[(C_6-C_{12})Aryl-(C_1-C_{21})-O-Alkyl]$ ester, 2,2,2-Trichlorodimethylethylphosphonat-,  $(C_1-C_6)$ Alkylphosphonat-,  $(C_6-C_{12})$ -Arylphosphonat-Brücke.

Bevorzugt ist der Ersatz durch eine Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-,  $NR^1R^2$ -Phosphoramidat-, Phosphat-O-Methylester-, Phosphat-O-ethylester-, Phosphat-O-isopropylester-, Methylphosphonat-, Phenylphosphonat-Brücke. Besonders bevorzugt ist der Ersatz durch eine Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-, Methylphosphonat-Brücke. Ganz besonders bevorzugt ist der Ersatz durch eine Phosphorothioat-Brücke.

$R^1$  und  $R^2$  stehen unabhängig voneinander für Wasserstoff oder für  $(C_1-C_{18})$ -Alkyl,  $(C_6-C_{20})$ -Aryl,  $(C_6-C_{14})$ -Aryl- $(C_1-C_6)$ -alkyl,  $-(CH_2)_c$ - $[NH(CH_2)_d-NR^3R^3]$  steht, worin  $c$  eine ganze Zahl von 2 bis 6 und  $d$  eine ganze Zahl von 0 bis 6 ist, und  $R^3$  unabhängig voneinander Wasserstoff,  $(C_1-C_6)$ -Alkyl oder  $(C_1-C_4)$ -Alkoxy- $C_1-C_6$ -alkyl ist; bevorzugt steht  $R^1$  und  $R^2$  für Wasserstoff,  $(C_1-C_6)$ -Alkyl oder Methoxyethyl, besonders bevorzugt für Wasserstoff,  $(C_1-C_4)$ -Alkyl oder Methoxyethyl.  $R^1$  und  $R^2$  können auch zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-6-gliedrigen heterocyclischen Ring bilden, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann.

Vorzugsweise sollen ein, zwei oder drei Phosphorsäurediesterbrücken am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende ersetzt werden, bevorzugt am 5'- und am 3'-Ende. Bevorzugt soll auch der Ersatz der Phosphorsäurediesterbrücken an den Pyrimidin-Positionen erfolgen.

b) Vollständiger oder teilweiser Ersatz der 3'- oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken durch "Dephospho"-Brücken [s. z. B. Uhlmann und Peyman in "Methods in Molecular Biology", Vol. 20: "Protocols for Oligonucleotides and Analogs", S. Agrawal, Ed., Humana Press, Totowa 1993, Chapter 16, 355ff], beispielsweise durch Formacetal, 3'-Thioformacetal, Methylhydroxylamin, Oxim, Methylendimethylhydrazo, Dimethylensulfon, Silylgruppen.

Bevorzugt ist der Ersatz durch Formacetale und 3'-Thioformacetale.

Vorzugsweise sollen ein, zwei oder drei Phosphorsäurediesterbrücken am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende ersetzt werden, bevorzugt am 5'- und am 3'-Ende. Bevorzugt soll auch der Ersatz der Phosphorsäurediesterbrücken an den Pyrimidin-Positionen erfolgen.

c) Vollständiger oder teilweiser Ersatz des Zuckerphosphat-Rückgrats, beispielsweise durch "Morpholinonucleosid"-Oligomere [E. P. Stirchak et al., Nucleic Acids Res. 17 : 6129, 1989] oder "Peptide Nucleic Acids" (PNA's) [P. E. Nielsen et al., Bioconl. Chem. 5 : 3, 1994], oder auch PNA/DNA-Hydrate, wie in der deutschen Patentanmeldung P 44 08 528.1 beschrieben.

d) Vollständiger oder teilweiser Ersatz der  $\beta$ -D-2'-Desoxyriboseeinheiten, beispielsweise durch  $\alpha$ -D-2'-Desoxyribose, L-2'-Desoxyribose, 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O- $(C_1-C_6)$ Alkyl-Ribose, 2'-O- $(C_2-C_6)$ Alkenyl-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose,  $\beta$ -D-Xylofuranose,  $\alpha$ -Arabinofuranose, 2,4-Dideoxy- $\beta$ -D-erythrohexo-pyranose, und carbocyclische [z. B. Froehler, J. Am. Chem. Soc. 114 : 8320, 1992] und offenkettige Zuckeranaloga [z. B. Vandendriessche et al., Tetrahedron 49 : 7223, 1993], Bicyclo-Zuckeranaloga [z. B. M. Tarkov et al., Helv. Chim. Acta 76 : 481, 1993].

Bevorzugt ist der Ersatz durch 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O- $(C_1-C_6)$ Alkyl-Ribose, 2'-O- $(C_2-C_6)$ Alkenyl-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose.

Besonders bevorzugt ist der Ersatz durch 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O- $(C_1-C_4)$ Alkyl-Ribose, 2'-O- $(C_2-C_4)$ Alkenyl-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose.

Ganz besonders bevorzugt ist der Ersatz durch 2'-O-Methyl-, 2'-O-Allyl-, 2'-O-Butylribose.

Vorzugsweise sollen ein, zwei oder drei Riboseeinheiten am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende ersetzt werden, bevorzugt am 5'- und am 3'-Ende. Bevorzugt soll auch der Ersatz der Riboseeinheiten an den Pyrimidin-Positionen erfolgen.

e) Vollständiger oder teilweiser Ersatz der natürlichen Nucleosid-Basen, beispielsweise durch 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Dihydrouracil, 5- $(C_1-C_6)$ -Alkyl-uracil, 5- $(C_2-C_6)$ -Alkenyl-uracil, 5- $(C_2-C_6)$ -Alkyluracil, 5- $(C_1-C_6)$ -Alkyl-cytosin, 5- $(C_2-C_6)$ -Alkenyl-cytosin, 5- $(C_2-C_6)$ -Alkylcytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, 7-Deaza-7-substituierte Purine. Bevorzugt ist der Ersatz durch 5- $(C_1-C_6)$ -Alkyl-uracil, 5- $(C_2-C_6)$ -Alkenyl-uracil,

5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, 7-Deaza-7-Alkynyl, bevorzugt hexinyl-substituierte Purine, 7-Deaza-7-Methyl-substituierte Purine, 7-Deaza-7-brom substituierte Purine.

Besonders bevorzugt ist der Ersatz durch 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkynyl-cytosin. Ganz besonders bevorzugt ist der Ersatz durch 5-Hexinylcytosin, 5-Hexinyluracil, 5-Hexinylcytosin, 5-Propinyluracil, 5-Propinylcytosin. Der Ersatz der Nucleosid-Basen soll nicht in den CAP-Bereichen erfolgen.

Von den obengenannten Modifikationen sind vor allem die Modifikationen aus den Gruppen a), b), c) und d), vor allem aus den Gruppen a) und d), insbesondere aus der Gruppe a) bevorzugt.

Zusätzlich können die erfindungsgemäßen Oligonucleotide beispielsweise am 3'- oder 5'-Ende mit Molekülen verbunden (konjugiert) sein, welche die Eigenschaften von Antisense-Oligonucleotiden oder von Tripelhelix bildenden Oligonucleotiden (wie beispielsweise Zellpenetration, Nucleaseabbau, Affinität zur Target-RNA/DNA, Pharmakokinetik) günstig beeinflussen. Beispiele sind Konjugate mit Poly-Lysin, mit Interkalatoren wie Pyren, Acridin, Phenazin, Phenanthridin, mit fluoreszierenden Verbindungen wie Fluorescein, mit Cross-Linkern wie Psoralen, Azidoproflavin, mit lipophilen Molekülen wie (C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>)-Alkyl, mit Lipiden wie 1,2-di-hexadecyl-rac-glycerin, mit Steroiden wie Cholesterin oder Testosteron, mit Vitaminen wie Vitamin E, mit Poly- bzw. Oligo-ethylenglycol, mit (C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl-Phosphatdiestern, mit -O-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-O-(C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl. Bevorzugt sind Konjugate mit lipophilen Molekülen wie (C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>)-Alkyl, mit Steroiden wie Cholesterin oder Testosteron, mit Poly- oder Oligoethylenglykol, mit Vitamin E, mit Interkalatoren wie Pyren, mit (C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl-Phosphatdiestern, mit -O-CH<sub>2</sub>-CH(OH)-O-(C<sub>12</sub>-C<sub>16</sub>)-Alkyl. Die Darstellung solcher Oligonucleotid-Konjugate ist dem Fachmann bekannt (s. z. B. Uhlmann & Peyman, Chem. Rev. 90: 543, 1990; M. Manoharan in "Antisense Research and Applications", Crooke and Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, 1993, Chapter 17, S. 303ff, EP 0552766A2).

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Oligonucleotide am 3' und/oder am 5'-Ende 3'-3'- und 5'-5'-Inversionen [beschrieben beispielsweise in M. Koga et al., J. Org. Chem. 56 : 3757, 1991] tragen.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen nach dem Fachmann bekannten Verfahren, insbesondere die chemische Synthese, die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen zur Herstellung eines Arzneimittels sowie ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die erfindungsgemäßen Oligonucleotide mit einem physiologisch annehmbaren Träger sowie gegebenenfalls geeigneten Zusatz- und/oder Hilfsstoffen vermischt.

Ganz generell erstreckt sich die vorliegende Erfindung auch auf die Verwendung von therapeutisch wirksamen Oligonucleotiden zur Herstellung eines Arzneimittels, bei denen mindestens ein nichtenständiges Pyrimidin-Nucleosid modifiziert ist. Als therapeutisch wirksame Oligonucleotide versteht man im allgemeinen Antisense Oligonucleotide, Tripelhelix-bildende-Oligonucleotide, Aptamere (RNA oder DNA-Moleküle die an spezifische Zielmoleküle, z. B. Proteine oder Rezeptoren, binden können (z. B. L.C. Bock et al., Nature 355: 564, 1992) oder Ribozyme (katalytische RNA, s. z. B. Castanetto et al., Critical Rev. Eukar. Gene Expr. 2 : 331, 1992), insbesondere Antisense-Oligonucleotide.

Darüberhinaus ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung die Verwendung von Oligonucleotiden mit mindestens einem nichtenständigen und modifizierten Pyrimidin-Nucleosid als Diagnostikum, beispielsweise zur Detektion der Präsenz oder Absenz oder der Menge eines spezifischen doppelsträngigen oder einzelsträngigen Nucleinsäuremoleküls in einer biologischen Probe.

Die Oligonucleotide haben für die erfindungsgemäße Verwendung eine Länge von ca. 6 bis 60, vorzugsweise von ca. 10 bis 40, insbesondere von ca. 12 bis 31 Nucleotiden. Ansonsten gelten auch hier die oben beschriebenen Vorzugsbereiche, Modifikationen bzw. Konjugationen.

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung können beispielsweise zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Viren hervorgerufen werden, beispielsweise durch HIV, HSV-1, HSV-2, Influenza, VSV, Hepatitis B oder Papilloma Viren, verwendet werden.

Erfindungsgemäße Antisense Oligonucleotide, die gegen solche Targets wirksam sind, sind beispielsweise:

a) gegen HIV, z. B.

5'-G\*G\*G\*G A C A C C C A A T T C T G A A A A T G\*G\*G\*G-3' oder  
5'-G\*G\*G\*G A C A C C \*C A A T \*T C \*T G A A A A T G\*G\*G\*G-3' oder  
5'-G\*G\*G G A C A C \*C \*C A A T T C T G A A A A T G\*G\*G\*G-3'

(1)

5'-G\*G\*G\*A G G T \*C C \*C \*T G T \*T \*C G G G C G C \*C A G \*G\*G\*G-3' oder  
5'-G\*G\*G\*A G G T \*C C \*C \*T G \*T T \*C G G G C G C \*C \*A \*G \*G \*G \*G-3'

(2)

5'-G\*G\*G\*G T\*C C\*C\*T G T\*T\*C G G G C G C\*C\*A\*G\*G\*G\*G-3'  
(26)

5

5'-G\*G\*G G T\*C G A\*C A C\*C C A A T\*T C\*T G A A A A T\*G G A  
T\*A\*A-3' oder

10

5'-G\*G\*G G T\*C G A\*C A C\*C C A A T\*T C\*T G A A A A T\*G G A  
T\*A\*A-3' oder

15

5'-G\*G\*G G T\*C G A\*C A C\*C C A A T\*T C\*T G A A A A T\*G G  
A\*T\*A\*A-3' oder

20

5'-G\*G\*G T\*C\*G A\*C A C\*C C A A T\*T\*C\*T G A A A A T\*G G  
A\*T\*A\*A-3'

(3)

25

5'-G\*C\*T A T G T\*C G A\*C A C C\*C C A A T\*T\*C\*T\*G A A A G\*G\*G\*G-3'  
oder

30

5'-G\*C\*T A T\*G T\*C G A\*C A C C\*C C A A T\*T\*C\*T\*G A A A G\*G\*G\*G-3'  
oder

35

5'-G\*C\*T A T\*G T\*C G A C A C\*C C\*A A T\*T C\*T G A A A G\*G\*G\*G-3'  
oder

5'-G\*C\*T A T\*G T\*C G A C\*A C\*C C\*A A T\*T C\*T G A A A G\*G\*G\*G-3'  
oder

40

5'-G\*C\*T A T G T\*C G A C A C\*C C\*A A T\*T C\*T G A A A G\*G\*G-3'

(4)

45

5'-G\*T\*C G C\*T G T C\*T\*C\*C G C T\*T C T T C T T C C\*T G\*G\*G\*G oder

5'-G\*T\*C G C\*T G T C\*T\*C\*C G C T\*T C T T C T T C C\*T G G\*G\*G\*G oder

50

5'-G\*T\*C G C\*T G T C\*T\*C\*C G C T\*T C T T C T T C C\*T G G\*G\*G\*G\*G

oder

(5)

55

5'-G\*T\*C\*T C\*C G C T\*T C\*T T\*C T\*T C\*C T G C\*C A T A G G\*G\*G\*G  
oder

60

5'-G\*T\*C\*T C\*C G C T\*T C\*T T\*C T\*T C\*C T G C\*C A T A G\*G\*G\*G oder

(6)

b) gegen HSV-1, z. B.

65

5'-G\*C\*G G G G C T C C\*A T G G G G G T\*C\*G\*G\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*C\*G G G G C\*T C C A\*T G G G G G T\*C\*G-3' oder

(7)

5

5'-G\*G\*G\*G A G G A T\*G C\*T\*G A G G A G G\*G\*G\*G oder  
 5'-G\*G\*G\*G A G G A T\*G C\*T\*G A G G A G G\*G\*G\*G oder

(28)

10

5'-G\*G\*G\*G A G G A T\*G C\*T G A G G\*G\*G\*G oder  
 5'-G\*G\*G G A G G A T\*G C\*T G A G G\*G\*G\*G oder

(29)

15

5'-G\*G\*G\*C A G G A G G A T\*G C\*T\*G A G G A G G\*G\*G\*G oder  
 5'-G\*G\*G\*G\*C A G G A G G A T\*G C\*T\*G A G G A G G\*G\*G\*G oder

(30)

20

25

Die hier angegebenen arabischen Zahlen beziehen sich auf die weiter vorne angegebenen ionischen Zahlen; die hier angegebenen Oligonucleotide sind zusätzlich mit den erfindungsgemäßen CAP's versehen. 30

Die durch eine Phosphorothioatbrücke (P=S) ersetzten Phosphordiesterbindungen wurden in den Sequenzen mit einem Sternchen (\*) markiert.

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise auch zur Behandlung von Krebs oder der Restenose. Beispielsweise können dabei Oligonucleotid-Sequenzen zum Einsatz kommen, die gegen Targets gerichtet sind, die für Krebsentstehung bzw. Krebswachstum verantwortlich sind. Solche Targets sind beispielsweise: 35

- 1) Nucleare Onkoproteine wie beispielsweise c-myc, N-myc, c-myb, c-fos, c-fos/jun, PCNA, p120
- 2) Cytoplasmische/Membran-assoziierte Onkoproteine wie beispielsweise EJ-ras, c-Ha-ras, N-ras, rrg, bcl-2, cdc-2, c-raf-1, c-mos, c-src, c-abl 40
- 3) Zelluläre Rezeptoren wie beispielsweise EG F-Rezeptor, c-erbA, Retinoid-Rezeptoren, Protein-Kinase regulatorische Untereinheit, c-fms
- 4) Cytokine, Wachstumsfaktoren, Extrazelluläre Matrix wie beispielsweise CSF— 1, IL-6, IL-1a, IL-1b, IL-2, IL-4, bFGF, Myeloblastin, Fibronectin, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). 45

Erfindungsgemäße Antisense-Oligonucleotide, die gegen solche Targets wirksam sind, sind beispielsweise

a) gegen c-Ha-ras, z. B.

50

5'-G\*G\*G\*G C A G C\*T G\*C A A C\*C\*C A G\*C G\*G\*G\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*C A G C\*T G\*C A A C\*C\*C A G\*C G\*G\*G\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G\*C\*A\*G\*C\*T\*G\*C\*A\*A\*C\*C\*C\*A\*G\*C\*G\*G\*G\*G-3' oder

(8)

55

c) c-myc, z. B.

60

65

5'-G\*G\*G\*G C\*T G C\*T G G A G\*C G G G G\*C A C\*A\*C-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G C\*T G C\*T G G A G\*C G G G G\*C A C\*A\*C\*G\*G\*G\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G\*C\*T\*G\*C\*T\*G\*G\*A\*G\*C\*G\*G\*G\*G\*C\*A\*C\*A\*C\*-3' oder  
 (9)

5'-G\*G\*G\*G A A\*C G T\*T G A G G G G C\*A\*T-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G A A\*C G T\*T G A G G G G C\*A\*T G\*G\*G\*G-3' oder  
 (10)

d) c-myb, z. B.

5'-G\*G\*G\*G T\*G C\*C G G G G T\*C\*T\*T C G G\*G\*C-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G T\*G C\*C G G G G T\*C\*T\*T C G G\*G\*C G\*G\*G\*G-3' oder  
 (11)

5'-G\*G\*G\*G T\*G C\*C\*G G G G T\*C T\*T\*C G G\*G\*G\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G T\*G C\*C\*G G G G T\*C T\*T\*C G G\*G\*G\*G-3' oder  
 (27)

e) c-fos, z. B.

5'-G\*G\*G\*G G A G A A C\*A T\*C A T\*G G T\*C G A A\*A\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G G A G A A C\*A T\*C A T\*G G T\*C G A A A G\*G\*G\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G G A G A A C\*A T\*C A T\*G G T\*C G A A A G\*G\*G\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*A G A A C\*A\*T\*C A T\*G G T\*C G A A\*A\*G\*G\*G\*G\*G-3' oder  
 (12)

5'-C\*C\*C\*G A G A A C A T\*C A T\*G G T\*C G A A\*A\*G\*G\*G\*G\*G-3' oder  
 (13)

5'-G\*G\*G G A A A G C\*C\*C G G\*C A A G G\*G\*G\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G G A A A G C\*C C\*G G C\*A A G G\*G\*G\*G-3'  
 (14)

f) p120, z. B.

5'-C\*A\*C\*C C\*G C\*C T\*T G G C C T\*C C\*C A\*C G G\*G\*G\*G-3' oder  
 5'-C\*A\*C\*C C\*G C\*C T\*T G G C C T\*C C\*C A\*C G G\*G\*G\*G-3' oder  
 (15)



g) EGF-Rezeptor, z. B.

5'-G\*G\*G\*G A C\*T\*C\*C G G\*C G\*C A G C\*G\*C -3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G A C\*T\*C\*C G G\*C G\*C A G C\*G\*C G\*G\*G\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*G G G A C\*T\*C\*C G G\*C G\*C A G C\*G\*C G G\*G\*G-3' oder

(16)

5'-G\*G\*G\*G C A A A C T\*T\*T C T T\*T\*T C C T\*C\*C-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G C A A A C T\*T\*T C T T\*T\*T C C T\*C\*C G G\*G\*G-3' oder

(17)

h) D53 Tumorsuppressor, z. B.

5'-G\*G\*G G G A A G G A G G A G G A T\*G A\*G\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*G G G A A G G A G G A G G A T\*G A G G G\*G\*G-3' oder

(18)

5'-G\*G\*G\*G\*C A G T\*C A T\*C\*C A G C\*T T\*C G G\*A\*G-3' oder  
 5'-G\*G\*G G\*C A G T\*C A T\*C\*C A G C\*T T\*C G G A G\*G\*G\*G-3' oder

(19)

i) bFGF, z. B.

5'-G\*G\*G G C\*T G C C A\*T G G T\* C\*C\*C-3'  
 5'-G\*G\*G\*G C\*T G C C A\*T G G T\* C C\*C G\*G\*G\*G-3'

(31)

j) VEGF, z. B.

5'-G\*G\*G\*GAAGT\*T\*CA\*TG GT\*T\*TCG\*G\*G\*G-3'

(34)

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflusst werden, beispielsweise durch VLA-4, VLA-2, ICAM oder ELAM.

Erfindungsgemäße Antisense-Oligonucleotide, die gegen solche Targets wirksam sind, sind beispielsweise

a) VLA-4, z. B.

5'-G\*G\*G\*G C\*A G\*T A A G C\*A T\*C\*C A T\*A\*T\*C-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G C\*A G\*T A A G C\*A T\*C\*C A T\*A T\*C G\*G\*G\*G-3' oder

(20)

b) ICAM, z. B.

5'-G\*G\*G\*G\*C\*C\* C C C A C\* C A C T\* T\* C\* C C C T C\* T\* C-3' oder  
 5'-C\*C\*C\*C\* C A C\* C A C T\* T\* C\* C C C T\* C\* T\* C\* G\* G\* G\* G-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G\*C\*C\* C\* C\* C A C\* C A C T\* T\* C\* C C C T\* C\* T\* C\* G\* G\* G\* G-3'  
 oder

(21)

5'-G\*G\*G\*C\* T\* C\* C C C A C\* C A C T\* T C C C\* C\* T\* C\* G\* G\* G\* G-3' oder  
 oder  
 5'-G\*G\*C\* T\* C\* C C C A C\* C A C T\* T C C C\* C\* T\* C\* G\* G\* G\* G-3' oder

(22)

5'-G\*G\*G\*G\*C\* T G G G A G C\* C A\* T A G\* C G A\* G\* G-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G\*C\* T G G G A G C\* C A\* T A G\* C G A\* G\* G\* G-3' oder  
 5'-G\*G\*G G\* C\* T G G G A G\* C\* C A\* T A G\* C G A G G\* G\* G-3' oder

(23)

c) ELAM-1, z. B.

5'-A\* C\* T G C\* T G C\* C T\* C T\* T G T\* C T\* C A\* G\* G\* G\* G-3' oder  
 5'-G\*G\*G\*G A C\* T G C\* T G C\* C T\* C T\* T G T\* C T\* C A G G\* G\* G-3' oder

(24)

5'-G\*G\*G\*G C\* A A T\* C A A T\* G A C\* T T\* C A A G A G T\* T\* C-3' oder  
 5'-C\* A\* A T C A A T\* G A C\* T T\* C A A G A G T\* T\* C G G\* G\* G-3'

(25)

Die Arzneimittel der vorliegenden Erfindung eignen sich beispielsweise ferner zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Faktoren wie TNF alpha ausgelöst werden.

Erfindungsgemäße Antisense-Oligonucleotide, die gegen solche Targets wirksam sind, sind beispielsweise

a) TNF-alpha, z. B.

55 5'-G\*G\*G\*G T C A T G G\* T G T C\* C T\* T T G C A\* G\* C\* C  
 5'-G\*G\*G\*G T\* C A\* T G G\* T G T C\* C T\* T\* T G\* C A G C\* C G\* G\* G\* G  
 5'-G\*G\*G\*G T\* C A\* T G G\* T G T C\* C T\* T\* T G\* C A G C\* C G G\* G\* G\* G oder  
 60

(32)

65 5'-G\*G\*G\*G T\* C A\* T G G\* T G T C\* C T\* T\* T G\* C A G G\* G\* G\* G  
 5'-T\* C\* A\* T G G\* T G\* T C\* C T\* T\* T G\* C A G G\* G\* G\* G

(33)

Bezüglich der Numerierung der beispielhaften Oligonucleotide und dem Sternchen-Symbol gilt obengesagtes. Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide können auch zur Herstellung eines Diagnostikums wenigstens gegen alle genannten Krankheiten verwendet werden.

Die Arzneimittel können z. B. in Form von pharmazeutischen Präparaten, die man oral, z. B. in Form von Tabletten, Dragees, Hart- oder Weichgelatine kapseln, Lösungen, Emulsionen oder Suspensionen verabreichen kann, verwendet werden. Sie können auch rektal z. B. in Form von Suppositorien oder parenteral z. B. in Form von Injektionslösungen verabreicht werden. Für die Herstellung von pharmazeutischen Präparaten können diese Verbindungen in therapeutisch inerten organischen und anorganischen Trägern verarbeitet werden. Beispiele von solchen Trägern für Tabletten, Dragees und Hartgelatine kapseln sind Laktose, Maisstärke oder Derivate davon, Talg und Stearinsäure oder Salze davon. Geeignete Träger für die Herstellung von Lösungen sind Wasser, Polyole, Saccharose, Invertzucker und Glucose. Geeignete Träger für Injektionslösungen sind Wasser, Alkohole, Polyole, Glycerol und pflanzliche Öle. Geeignete Träger für Suppositorien sind pflanzliche und gehärtete Öle, Wachse, Fette und halbflüssige Polyole. Die pharmazeutischen Präparate können auch Konservierungsmittel, Lösemittel, Stabilisierungsmittel, Netzmittel, Emulgatoren, Süßstoffe, Farbstoffe, Geschmacksmittel, Salze zur Veränderung des osmotischen Drucks, Puffer, Überzugsmittel, Antioxidantien, sowie ggf. andere therapeutische Wirkstoffe enthalten.

Bevorzugt sind orale Verabreichung und Injektionen. Für die Injektion werden die Antisense-Oligonucleotide in einer flüssigen Lösung, vorzugsweise in einem physiologisch annehmbaren Puffer, wie z. B. Hank's Lösung oder Ringer's Lösung, formuliert. Die Antisense-Oligonucleotide können aber auch in fester Form formuliert werden und vor dem Gebrauch gelöst oder suspendiert werden.

Die für die systematische Verabreichung bevorzugten Dosierungen betragen ca. 0,01 mg/kg bis ca. 50 mg/kg Körpergewicht und Tag.

Die folgenden Beispiele sollen nun die Erfindung näher erläutern. Tabelle 1 zeigt Oligonucleotide, die auf ihre in vitro Aktivität gegen HSV-1 geprüft wurden. Das Oligonucleotid No. 4 ist wie bei Mann et al. (Bioconj. Chem. 3 : 554, 1992) beschrieben durch die Einführung eines [4-(1-pyrenyl)butanyl]phosphodiester am 5'-Ende modifiziert. Die erfindungsgemäßen Oligonucleotide wirken bereits bei einer minimalen Hemmkonzentration von 9  $\mu$ M (Bspe. 1 und 4) oder sogar schon von 3  $\mu$ M (Bspe. 2 und 3).

#### Beispiel 1

##### Oligonucleotidsynthese

Unmodifizierte Oligonucleotide wurden auf einem automatischen DNA Synthesizer (Applied Biosystems Model 380B oder 394) unter Anwendung der Standard Phosphoramidit-Chemie und Oxidation mit Jod synthetisiert. Zur Einführung von Phosphorthioat-Brücken in gemischten Phosphorothioaten und Phosphodiester Oligonucleotiden wurde anstelle von Jod mit TETD (Tetraethylthiuramdisulfid) oxidiert (Applied Biosystems User Bulletin 65). Nach Abspaltung vom festen Träger (CPG oder Tentagel) und Entfernung der Schutzgruppen mit konz.  $\text{NH}_3$  bei 55°C während 18h, wurden die Oligonucleotide zunächst durch Butanol-Fällung (Sawadogo, Van Dyke, Nucl. Acids Res. 19 : 674, 1991) gereinigt. Anschließend wurde das Natriumsalz erhalten durch Ausfällung aus einer 0,5 M NaCl Lösung mit 2,5 Volumenteilen Ethanol.

Die Analyse der Oligonucleotide erfolgte durch

- Analytische Gelelektrophorese in 20% Acrylamid, 8M Harnstoff, 45 mM Trisborat Puffer, pH 7.0 und/oder
  - HPLC-Analyse: Waters GenPak FAX, Gradient  $\text{CH}_3\text{CN}$  (400ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (1 .6l),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (3.1g), NaCl (11.7g), pH6.8 (0.1M an NaCl) nach  $\text{CH}_3\text{CN}$  (400ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (1.6l),  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (3.1g), NaCl (175.3g), pH6.8 (1.5M an NaCl) und/oder
  - Kapillargelelektrophorese Beckmann Kapillare eCAP<sup>TM</sup>, U100P Gel Column, 65 cm length, 100  $\mu$ m I.D., window 15 cm from one end, Puffer 140 pM Tris, 360mM Borsäure, 7M Harnstoff und/oder
  - Elektrospray Massenspektroskopie
- Die Analyse der Oligonucleotide ergab, daß diese jeweils in einer Reinheit von größer als 90% vorlagen.

#### Beispiel 2

##### Untersuchung der antiviralen Aktivität von Prüfsubstanzen gegen Herpesviren in vitro

Die antivirale Aktivität der Prüfsubstanzen gegen verschiedene humanpathogene Herpesviren wird im Zellkulturtestsystem untersucht.

Für den Versuch werden Affennierenzellen (Vero,  $2 \times 10^5/\text{ml}$ ) in serumhaltigem Dulbecco's MEM (5% Fötale Kälberserum (FCS)) in 96-Napf-Mikrotiterplatten ausgesät und 24 h bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Das serumhaltige Medium wird dann abgesaugt und die Zellen werden zweimal mit serumfreiem Dulbecco's MEM überspült.

Die Testsubstanzen werden in  $\text{H}_2\text{O}$  auf eine Konzentration von 600  $\mu$ M vorverdünnt und bei -18°C aufbewahrt. Für den Test erfolgen weitere Verdünnungsschritte in Dulbecco's Minimal Essential Medium (MEM). Je 100  $\mu$ l der einzelnen Prüfsubstanzverdünnungen werden zusammen mit 100  $\mu$ l serumfreiem Dulbecco's MEM (-FCS) zu den gespülten Zellen gegeben.

Nach 3 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> werden die Zellen mit Herpes Simplex Virus Typ 1 (ATCC VR733, HSV-1 F-strain) oder mit Herpes Simplex Virus Typ 2 (ATCC VR734, HSV-2 G-Strain) infiziert in Konzentrationen, bei denen der Zellrasen innerhalb von 3 Tagen vollkommen zerstört wird. Bei HSV-1 beträgt die Infektionsstärke 500 Plaque-bildende Einheiten (PFU) pro Napf, bei HSV-2 350 PFU/Napf. Die Versuchsansätze enthalten dann Prüfsubstanz in Konzentrationen von 80 µM bis 0,04 µM in MEM, ergänzt durch 100 U/ml Penicillin G und 100 mg/l Streptomycin. Alle Versuche werden als Doppelbestimmung durchgeführt mit Ausnahme der Kontrollen, die achtfach je Platte durchgeführt werden.

Die Versuchsansätze werden 17 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Cytotoxizität der Prüfsubstanzen wird nach 20 h Gesamtinkubationszeit durch mikroskopische Begutachtung der Zellkulturen bestimmt. Als Dosis tolerata maxima (DTM) wird die höchste Präparatkonzentration bezeichnet, die unter den genannten Versuchsbedingungen noch keine mikroskopisch erkennbaren Zellschädigungen hervorruft.

Es erfolgt daraufhin die Zugabe von FCS auf eine Endkonzentration von 4% mit weiterer Inkubation für 55 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die unbehandelten Infektionskontrollen zeigen dann einen kompletten cytopathischen Effekt (CPE). Nach mikroskopischer Begutachtung der Zellkulturen werden diese dann mit Neutralrot entsprechend dem Vitalfärbungsverfahren nach Finter (1966) angefärbt. Die antivirale Aktivität einer Testsubstanz wird definiert als minimale Hemmkonzentration (MHK), die benötigt wird, um 30–60% der Zellen vor dem virusbedingten cytopathogenen Effekt zu schützen.

Tabelle 1: Aktivität von verschiedenen modifizierten Antisense-Oligonucleotiden gegen HSV-1 in Zellkultur. Die durch eine Phosphorothioatbrücke (P=S) ersetzte Phosphodiesterbindungen wurden in der Sequenz mit \* markiert; HMK = minimale Hemmkonzentration; DTM = Dosis tolerata maxima; Py = Pyren.

Tabelle 1

Sequenz	MHK	DTM
01 5'- G*G*G*C A G G A G G A T*G C*T*G A G G A G G*G*G*G	9	> 80
02 5' G*G*G*G G A G G A T*G C*T*G A G G A G G*G*G*G	3	> 80
03 5' G*G*G*G G A G G A T*G C*T G A G G*G*G*G	3	> 80
04 5' PY-G*G*G*G G A G G A T*G C*T G A G G*G*G*G	9	> 80

## Patentansprüche

1.) Oligonucleotide der Formel

5'-(CAP)-(Oligo)-(CAP)-3'

wobei (Oligo) für eine Nucleotidsequenz der Länge 10 bis 40 Nucleotide steht und CAP für G<sub>m</sub> steht, wobei m eine ganze Zahl von null bis zehn, bevorzugt von zwei bis sechs, besonders bevorzugt von drei bis fünf und ganz besonders bevorzugt vier bedeutet und wobei beide im Molekül vorkommenden CAP's unabhängig voneinander definiert sein können und im Falle, wenn m am 5'- oder 3'-Ende gleich null ist und das Ende der "Oligo"-Sequenz von keinem Guanin gebildet wird, verschieden sein müssen.

2.) Oligonucleotide nach Anspruch 1, wobei die Nucleotidsequenz des "(Oligo)"-Anteils aus solchen Bereichen von Genen stammt, die für die Transkription der DNA oder die Translation der korrespondierenden mRNA bedeutsam sind.

3.) Oligonucleotide nach den Ansprüchen 1 und 2, wobei (Oligo) für

ACACCCAATTCTGAAAATGG	(I),	
AGGTCCCTGTTCTGGGCGCCA	(II),	
GTCGACACCCAATTCTGAAAATGGATAA	(III),	5
GCTATGTCGACACCCAATTCTGAAA	(IV),	
GTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTTCCTG	(V),	10
GTCTCCGCTTCTTCTTCCTGCCATAGG	(VI),	
GCGGGGCTCCATGGGGGTCTG	(VII),	
CAGCTGCAACCCAGC	(VIII),	15
GGCTGCTGGAGCGGGGCACAC	(IX),	
AACGTTGAGGGGCGAT	(X),	20
GTGCCGGGGTCTTCGGGC	(XI),	
GGAGAACATCATGGTCGAAAG	(XII),	
CCCGAGAACATCATGGTCGAAG	(XIII),	25
GGGGAAAGCCCGGCAAGGGG	(XIV),	
CACCCGCCTTGGCCTCCAC	(XV),	
GGGACTCCGGCGCAGCGC	(XVI),	30
GGCAAACCTTTCTTTCTCTCC	(XVII),	
GGGAAGGAGGAGGATGAGG	(XVIII),	35
GGCAGTCATCCAGCTTCGGAG	(XIX),	
GCAGTAAGCATCCATATC	(XX),	
CCCCCACCCTTCCCCTCTC	(XXI),	40
CTCCCCCACCCTTCCCCTC	(XXII),	
GCTGGGAGCCATAGCGAGG	(XXIII),	45
ACTGCTGCCTCTTGTCTCAGG	(XXIV),	
CAATCAATGACTTCAAGAGTTC	(XXV),	
GGTCCCTGTTCTGGGCGCCA	(XXVI),	50
GTGCCGGGGTCTTCGGG	(XXVII),	
GGAGGATGCTGAGGAGG	(XXVIII),	
GGAGGATGCTGAGG	(XXIX),	55
CAGGAGGATGCTGAGGAGG	(XXX),	
GGCTGCCATGGTCCC	(XXXI),	60
TCATGGTGTCTTTGCAGCC	(XXXII),	
TCATGGTGTCTTTGCAG	(XXXIII),	
AAGTTCATGGTTTCGG	(XXXIV),	65

4.) Oligonucleotide nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Sequenzen C\*A\*GGAGGAT\*GC\*T\*GAGGA\*G\*G, bevorzugt G\*G\*G\*CAGGAGGAT\*GC\*T\*GAG-GAGG\*G\*G\*G, PY-G\*G\*G\*GGAGGAT\*GC\*TGAGG\*G\*G\*G, und besonders bevorzugt G\*G\*G\*GGAGGAT\*GC\*T\*GAGGAGG\*G\*G\*G und G\*G\*G\*GGAGGAT\*GC\*TGAGG\*G\*G\*G haben.

5.) Oligonucleotide nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonucleotide modifiziert sind.

6.) Oligonucleotide nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß 2 bis 10 nichtendständige Pyrimidin-Nucleoside modifiziert sind.

7.) Oligonucleotide nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonucleotide am 5'-endständigen und/oder am 3'-entständigen Nucleotid modifiziert sind.

8.) Oligonucleotide nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß ein oder mehrere Gruppen von mindestens 1 bis 4 miteinander verbundenen Nukleotiden nicht modifiziert sind.

9.) Oligonucleotide nach einem der Ansprüche 5 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation definiert ist als

(a) vollständiger oder teilweiser Ersatz der 3'- und/oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken und/oder

(b) vollständiger oder teilweiser Ersatz der 3'- oder 5'-Phosphorsäurediesterbrücken durch "Dephospho"-Brücken und/oder

(c) vollständiger oder teilweiser Ersatz des Zuckerphosphat-Rückgrats und/oder

(d) vollständiger oder teilweiser Ersatz der  $\beta$ -D-2'-Desoxyriboseeinheiten und/oder

(e) vollständiger oder teilweiser Ersatz der natürlichen Nucleosid-Basen.

10.) Oligonucleotide nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation definiert ist als

(a) eine Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-, (NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)-Phosphoramidat-, Boranophosphat-, Phosphat-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-Alkylester, Phosphat-[(C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)Aryl-(C<sub>1</sub>-C<sub>21</sub>)-O-Alkyl]ester, 2,2,2-Trichlorodimethylethylphosphonat-, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>)Alkylphosphonat-, (C<sub>6</sub>-C<sub>12</sub>)-Arylphosphonat-Brücke, bevorzugt eine Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-, (NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup>)-Phosphoramidat-, Phosphat-O-Methylester-, Phosphat-O-ethylester-, Phosphat-O-isopropylester-, Methylphosphonat-, Phenylphosphonat-Brücke, besonders bevorzugt eine Phosphorothioat-, Phosphorodithioat-, Methylphosphonat-Brücke und ganz besonders bevorzugt eine Phosphorothioat-Brücke,

wobei

R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> unabhängig voneinander für Wasserstoff oder für (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)-Alkyl, (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>)-Aryl, (C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>)-Aryl-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-alkyl, -(CH<sub>2</sub>)<sub>c</sub>-[NH(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>]-NR<sup>3</sup>R<sup>3</sup> steht, worin c eine ganze Zahl von 2 bis 6 und d eine ganze Zahl von 0 bis 6 ist, und R<sup>3</sup> unabhängig voneinander Wasserstoff, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl oder (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkoxy-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-alkyl ist; bevorzugt steht R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> für Wasserstoff, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl oder Methoxyethyl, besonders bevorzugt für Wasserstoff, (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)-Alkyl oder Methoxyethyl stehen oder R<sup>1</sup> und R<sup>2</sup> zusammen mit dem sie tragenden Stickstoffatom einen 5-6-gliedrigen heterocyclischen Ring bilden, der zusätzlich ein weiteres Heteroatom aus der Reihe O, S, N enthalten kann;

(b) Formacetal, 3'-Thioformacetal, Methylhydroxylamin, Oxim, Methylendimethylhydrazo, Dimethylensulfon oder Silylgruppen, bevorzugt Formacetale und 3'-Thioformacetale;

wobei vorzugsweise ein, zwei oder drei Phosphorsäurediesterbrücken am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende ersetzt werden, bevorzugt am 5'- und am 3'-Ende, vorzugsweise der Ersatz der Phosphorsäurediesterbrücken an den Pyrimidin-Positionen erfolgen soll;

(c) "Morpholinonucleotid"-Oligomer;

(d)  $\alpha$ -D-2'-Desoxyribose, L-2'-Desoxyribose, 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-Ribose, 2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenyl-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose,  $\beta$ -D-Xylofuranose,  $\alpha$ -Arabinofuranose, 2,4-Dideoxy- $\beta$ -D-erythro-hexo-pyranose, carbocyclische, offenkettige oder Bicyclo-Zuckeranaloga, vorzugsweise als 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)Alkyl-Ribose, 2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)Alkenyl-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose, besonders bevorzugt als 2'-F-2'-Desoxyribose, 2'-O-(C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)Alkyl-Ribose, 2'-O-(C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>)Alkenyl-Ribose, 2'-NH<sub>2</sub>-2'-desoxyribose, ganz besonders bevorzugt als 2'-O-Methyl-, 2'-O-Allyl-, 2'-O-Butylribose,

wobei vorzugsweise ein, zwei oder drei Riboseeinheiten am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende ersetzt werden, bevorzugt am 5'- und am 3'-Ende, vorzugsweise der Ersatz der Riboseeinheiten an den Pyrimidin-Positionen erfolgen soll;

(e) 5-(Hydroxymethyl)uracil, 5-Aminouracil, Pseudouracil, Dihydrouracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, bevorzugt als 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-Fluoruracil, 5-Fluorcytosin, 5-Chloruracil, 5-Chlorcytosin, 5-Bromuracil, 5-Bromcytosin, besonders bevorzugt als 5-(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-uracil, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-uracil, 5-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkenyl-cytosin, 5-(C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>)-Alkyl-cytosin, ganz besonders bevorzugt als 5-Pentinylyl-cytosin, 5-Hexinylyluracil, 5-Hexinylylcytosin,

wobei der Ersatz der Nucleosid-Basen nicht in den CAP-Bereichen erfolgen soll,

wobei von den obengenannten Modifikationen vor allem die Modifikationen aus den Gruppen a), b), c) und d), vor allem aus den Gruppen a) und d), insbesondere aus der Gruppe a) bevorzugt sind.

11.) Oligonucleotide nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie am 5'- und/oder am 3'-Ende mit Molekülen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Poly-Lysin, Interkalatoren wie Pyren, Acridin, Phenazin, Phenanthridin, fluoreszierenden Verbindungen wie Fluorescein, Cross-Linkern wie Pso-

ralen, Azidoproflavin, lipophilen Molekülen wie (C<sub>12</sub>—C<sub>20</sub>)-Alkyl, Lipiden wie 1,2-di-hexadecyl-rac-glycerin, Steroiden wie Cholesterin oder Testosteron, Vitaminen wie Vitamin E und Poly- bzw. Oligoethylenglycol, (C<sub>12</sub>—C<sub>18</sub>)-Alkyl-Phosphatdiestern, —O—CH<sub>2</sub>—CH(OH)—O—(C<sub>12</sub>—C<sub>18</sub>)-Alkyl, bevorzugt aus lipophilen Molekülen wie (C<sub>12</sub>—C<sub>20</sub>)-Alkyl und Steroiden wie Cholesterin oder Testosteron, Poly- oder Oligoethylenglykol, Vitamin E, Interkalatoren wie Pyren und (C<sub>14</sub>—C<sub>18</sub>)-Alkyl-Phosphatdiestern und —O—CH<sub>2</sub>—CH(OH)—O—(C<sub>12</sub>—C<sub>16</sub>)-Alkyl verbunden sind. 5

12.) Oligonucleotide nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie am 5'- und/oder ein 3'-Ende 3'-3'- und/oder 5'-5'-Inversionen enthalten.

13.) Verfahren zur Herstellung der Oligonucleotide gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie chemisch synthetisiert werden. 10

14.) Arzneimittel enthaltend ein oder mehrere Oligonucleotide gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 und einen physiologisch annehmbaren Träger sowie gegebenenfalls geeignete Zusatz- und/oder Hilfsstoffe.

15.) Verwendung der Oligonucleotide gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Erkrankungen, die durch Viren hervorgerufen werden, zur Behandlung von Krebs, Restenose oder von Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflusst werden oder die durch diffusible Faktoren wie TNF alpha ausgelöst werden. 15

16.) Verwendung der Oligonucleotide gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Herstellung eines Diagnostikums für Erkrankungen, die durch Viren hervorgerufen werden, für Krebs, Restenose oder für Erkrankungen, die durch Integrine oder Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren beeinflusst werden oder durch diffusible Faktoren wie TNF alpha ausgelöst werden. 20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -